EnVision™ FLEX, High pH, (Link)

Code K8000

4th edition/ 4ème édition/ 4. Ausgabe

The kit contains reagents sufficient for 400-600 tests. For Autostainer Link instruments.

Les réactifs contenus dans ce kit permettent d'effectuer 400 à 600 tests. Pour les appareils Autostainer Link.

Die in diesem Kit enthaltenen Reagenzien sind ausreichend für 400–600 Tests. Für Autostainer Link Geräte.

Optional reagents/ Réactifs en option/ Optionale Reagenzien:

Code	Product name/ Nom du produit/ Produktname	Tests
K8004	EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution, High pH (50x)	200-430
K8005	EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution, Low pH (50x)	200-430
K8006	EnVision™ FLEX Antibody Diluent	400-600
K8007	EnVision™ FLEX Wash Buffer (20x)	
K8008	EnVision™ FLEX Hematoxylin, (Link)	400-600
K8009	EnVision™ FLEX+ Rabbit (LINKER), (Link)	130-200
K8021	EnVision™ FLEX+ Mouse (LINKER), (Link)	130-200

Other options/ Autres options/ Weitere Optionen:

K8020	FLEX IHC Microscope Slides	500

Contents/ Table des matières/ Inhalt

Page/ Page/ Seite

ENGLISH

Intended Use 4
Summary and Explanation 4
Reagents 5
A. Materials provided 5
B. Materials required but not provided 5
C. Optional reagents 6
Precautions 7
Storage 7
Reagent Preparation 8
Specimen Collection and Preparation 8
Procedure 9
A. Pre-treatment procedure 9
B. Staining procedure 10
Quality Control 11
Interpretation of Results 11
Limitations 11
Explanation of symbols 30

FRANÇAIS

Utilisation prévue 12
Résumé et explication 12
Réactifs 13
A. Matériel fourni 13
B. Matériel requis mais non fourni 13
C. Réactifs en option 14
Précautions 15
Conservation 16
Préparation des réactifs 16
Prélèvement et préparation des échantillons 17
Procédure 17
A. Procédure de prétraitement 17
B. Procédure de coloration 19
Contrôle qualité 19
Interprétation des résultats 19
Limites 20
Explication des symboles 30

DEUTSCH

Verwendungszweck 21
Zusammenfassung und Erklärung 21
Reagenzien 22
A. Mitgelieferte Materialien 22
B. Erforderliches, aber nicht mitgeliefertes Material 22
C. Optionale Reagenzien 23
Vorsichtsmaßnahmen 24
Lagerung 24
Reagenzvorbereitung 25
Entnahme und Vorbereitung der Probe 25
Verfahren 26
A. Arbeitsablauf der Vorbehandlung 26
B. Arbeitsablauf des Färbens 28
Qualitätskontrolle 28
Auswertung der Ergebnisse 28
Einschränkungen 29
Erläuterung der Symbole 30

ENGLISH

Intended Use

For in vitro diagnostic use.

Dako EnVision™ FLEX detection system is intended for use in immunohistochemistry together with Autostainer Link instruments. The system detects primary mouse and rabbit antibodies and the reaction is visualized by EnVision™ FLEX DAB+ Chromogen. If used with EnVision™ FLEX+ Rabbit (LINKER) (Code K8009) or EnVision™ FLEX+ Mouse (LINKER) (Code K8021) signal amplification of primary rabbit antibodies or primary mouse antibodies, respectively, can be achieved. The EnVision™ FLEX reagents are intended for use on formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections.

Summary and Explanation

Dako EnVision™ FLEX detection system, has been designed to be a flexible system and gives an optimal staining on Autostainer Link instruments, when using the protocol recommended in this package insert.

Prior to staining formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections should be subjected to deparaffinization and hydration followed by heat-induced epitope retrieval (HIER) using the target retrieval method specified in the package insert for the primary antibody. Please also see Procedure section for 3-in-1 specimen preparation. Code K8000 includes EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution, High pH (50x) (DM828). Alternatively, EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution, High pH (50x) (Code K8004) or EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution, Low pH (50x) (Code K8005) is recommended. Some primary antibodies require enzymatic pre-treatment of tissue for optimal staining instead of HIER.

Endogenous peroxidase should be blocked with EnVision™ FLEX Peroxidase-Blocking Reagent (SM801) included in the kit. Due to an effective washing procedure and the presence of stabilizing proteins in the Dako reagents, extra blocking steps to reduce non-specific background staining are unnecessary.

EnVision™ FLEX Wash Buffer (20x) (DM831) included in the kit or available as optional reagent (Code K8007) is recommended.

Primary antibodies are not provided with the kit. We recommend the use of Dako FLEX Ready-to-Use Primary Antibodies or Dako concentrated Primary Antibodies. EnVision™ FLEX Antibody Diluent (Code K8006) is recommended for the dilution of Dako concentrated Primary Antibodies.

EnVision™ FLEX+ Rabbit (LINKER) (Code K8009) may be applied for an optional signal amplification of rabbit primary antibodies. For signal amplification when using mouse primary antibodies, EnVision™ FLEX+ Mouse (LINKER) (Code K8021 or included in Code K8002) may be applied. As a guideline: EnVision™ FLEX+ Rabbit (LINKER) provides 2–3 fold signal amplification and EnVision™ FLEX+ Mouse (LINKER) provides 4-5 fold signal amplification.

Dako EnVision™ FLEX /HRP detection reagent (SM802) in the kit consists of a dextran backbone to which a large number of peroxidase (HRP) molecules and secondary antibody molecules have been coupled. A unique chemistry is used for the coupling reaction, which permits the binding of up to 100 HRP molecules and up to 20 antibody molecules per backbone.

The substrate system in the kit consists of two components: EnVision™ FLEX DAB+ Chromogen (DM827), a concentrated diaminobenzidine (DAB) solution, and EnVision™ FLEX Substrate Buffer (SM803) containing hydrogen peroxide. Before use EnVision™ FLEX DAB+ Chromogen must be diluted in EnVision™ FLEX Substrate Buffer. The substrate system produces a crisp brown end product at the site of the target antigen.

EnVision™ FLEX Hematoxylin (Code K8008) is recommended for counterstaining. The reagent provides a clear blue, nuclear staining.

The stained tissue sections may be mounted with either aqueous or organic-solvent-based mounting medium.

Reagents

A. Materials provided

SM801

EnVision™ FLEX PEROXIDASE-BLOCKING REAGENT

EnVision™ FLEX Peroxidase-Blocking Reagent
3 x 40 mL, ready-to-use
Phosphate buffer containing hydrogen peroxide, 15 mmol/L NaN_3 and detergent.

SM802

EnVision™ FLEX /HRP

EnVision™ FLEX /HRP
3 x 40 mL, ready-to-use
Dextran coupled with peroxidase molecules and goat secondary antibody molecules against rabbit and mouse immunoglobulins. In buffered solution containing stabilizing protein and preservative.

DM827

EnVision™ FLEX DAB+ CHROMOGEN

EnVision™ FLEX DAB+ Chromogen
3 x 3 mL
3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride in organic solvent.
The color of this reagent may vary from strong violet to colorless without having any influence on the performance of the kit.

SM803

EnVision™ FLEX SUBSTRATE BUFFER

EnVision™ FLEX Substrate Buffer
12 x 20 mL
Buffered solution containing hydrogen peroxide and preservative.

DM828

EnVision™ FLEX TARGET RETRIEVAL SOLUTION HIGH pH (50x)

EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution, High pH (50x)
9 x 30 mL, 50x concentrated
Tris/EDTA buffer, pH 9

DM831

EnVision™ FLEX WASH BUFFER (20x)

EnVision™ FLEX Wash Buffer (20x)
4 x 1 L, 20x concentrated
Tris-buffered saline solution containing Tween 20, pH 7.6 (±0.1).

B. Materials required but not provided

Autostainer Link instrument

Dako PT Link

Dako Proteinase K, Ready-to-Use (if necessary)

Dako FLEX Ready-to-Use Primary Antibodies or suitably diluted concentrated primary rabbit or mouse antibodies from Dako

Dako FLEX Ready-to-Use Rabbit or Mouse Universal Negative Control or suitable negative control reagent for the primary antibody

Dako instrumentation utensils

Microscope slides, e.g. FLEX IHC Microscope Slides

General laboratory reagents for deparaffinization of paraffin-embedded tissue sections

Mounting medium (aqueous or organic-solvent-based) and coverslips

C. Optional reagents

K8004
DM828

EnVision™ FLEX
TARGET RETRIEVAL SOLUTION
HIGH pH (50x)

EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution, High pH (50x)
3 x 30 mL, 50x concentrated
Tris/EDTA buffer, pH 9

K8005
DM829

EnVision™ FLEX
TARGET RETRIEVAL SOLUTION
LOW pH (50x)

EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution, Low pH (50x)
3 x 30 mL, 50x concentrated
Citrate buffer, pH 6.1

K8006
DM830

EnVision™ FLEX
ANTIBODY DILUENT

EnVision™ FLEX Antibody Diluent
120 mL, ready-to-use
Tris buffer, pH 7.2, containing 15 mmol/L NaN_3, and protein.

K8007
DM831

EnVision™ FLEX
WASH BUFFER (20x)

EnVision™ FLEX Wash Buffer (20x)
1 L, 20x concentrated
Tris-buffered saline solution containing Tween 20, pH 7.6 (±0.1).

K8008
SM806

EnVision™ FLEX
HEMATOXYLIN

EnVision™ FLEX Hematoxylin
3 x 45 mL, ready-to-use
Aqueous solution of hematoxylin.

K8009
SM805

EnVision™ FLEX+
RABBIT (LINKER)

EnVision™ FLEX+ Rabbit (LINKER)
40 mL, ready-to-use
Buffered solution containing stabilizing protein and an antimicrobial agent.
Contains reagent sufficient for 130-200 tests based on the use of 200-300 µL per test.

K8021
SM804

EnVision™ FLEX+
MOUSE (LINKER)

EnVision™ FLEX+ Mouse (LINKER)
40 mL, ready-to-use
Buffered solution containing stabilizing protein and an antimicrobial agent.
Contains reagent sufficient for 130-200 tests based on the use of 200-300 µL per test.

Precautions

1. For professional users.
2. EnVision™ FLEX /HRP, EnVision™ FLEX+ Mouse (LINKER), and EnVision™ FLEX+ Rabbit (LINKER) contain material of animal origin and it cannot be excluded that trace amounts of human material could be present due to manufacturing procedures. As with any product derived from biological sources, proper handling should be used.
3. Do not expose EnVision™ FLEX Peroxidase-Blocking Reagent, EnVision™ FLEX /HRP, EnVision™ FLEX Substrate Buffer, EnVision™ FLEX DAB+ Chromogen, EnVision™ FLEX Substrate Working Solution or EnVision™ FLEX Hematoxylin to strong light during the procedure.
4. For EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution, High pH (50x) and EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution, Low pH (50x), a safety data sheet is available for professional users on request.
5. For EnVision™ FLEX Wash Buffer (20x), a safety data sheet is available for professional users on request.
6. For EnVision™ FLEX Peroxidase-Blocking Reagent, a safety data sheet is available for professional users on request.
7. EnVision™ FLEX DAB+ Chromogen contains 1–5% 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride, and is labeled:
   Harmful.
   R40 Limited evidence of a carcinogenic effect.
   R43 May cause sensitisation by skin contact.
   R68 Possible risk of irreversible effects.
   S35 This material and its container must be disposed of in a safe way.
   S36/37 Wear suitable protective clothing and gloves.
   As a general rule, persons under 18 years of age are not allowed to work with this product. Users must be carefully instructed in the proper work procedure, the dangerous properties of the product and the necessary safety instructions (per European Union Directive 94/33/EC). Please refer to the Material Safety Sheet (MSDS) for additional information.

   USA: 3,3'-diaminobenzidine (DAB) may be harmful by inhalation, in contact with skin and if swallowed. Material is irritating to eyes and skin. If skin contact should occur, rinse affected area with soap and water.
   NOTE: Although diaminobenzidine is structurally related to benzidine there is no evidence for the carcinogenicity of diaminobenzidine. Consult Federal State, or local regulations for disposal.
8. EnVision™ FLEX Antibody Diluent (Code K8006) contains sodium azide (NaN_3), a chemical highly toxic in pure form. At product concentrations, though not classified as hazardous, sodium azide may react with lead and copper plumbing to form highly explosive build-ups of metal azides. Upon disposal, flush with large volumes of water to prevent metal azide build-up in plumbing.
9. Wear appropriate Personal Protective Equipment to avoid contact with eyes and skin.
10. Unused solution should be disposed of according to local, State and Federal regulations.

Storage

Store EnVision™ FLEX and EnVision™ FLEX+ reagents at 2–8 °C.
Store EnVision™ FLEX Peroxidase-Blocking Reagent, EnVision™ FLEX /HRP and EnVision™ FLEX Substrate Buffer in the dark at 2–8 °C.
Store EnVision™ FLEX Hematoxylin (Code K8008) in the dark at room temperature. Do not use after expiration date stamped on the vials. If reagents are stored under any conditions other than those specified, the conditions must be verified by the user. The prepared Substrate Working Solution should be stored in the dark at 2–8 °C and used within 5 days. If unexpected staining is observed which cannot be explained by variations in laboratory procedures and a problem with the product is suspected, contact Dako Technical Services.

Reagent Preparation

A.1 EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution, High pH (50x) (DM828, Code K8004)

Dilute a sufficient quantity of EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution, High pH (50x) 1:50 using distilled or deionised water for the staining procedure that is planned. If Dako PT Link is used for pre-treatment, dilution can be performed by emptying the content of the Target Retrieval Solution (50x) vial into the Dako PT Link tank and adding distilled or deionised water to the marked line (Fill Line). Unused diluted solution may be stored at 2–8 °C for one month. Discard solution if cloudy in appearance. When used in PT Link for 3-in-1 specimen preparation procedure, the diluted solution can be used 3 times within a 5 day period if stored at room temperature.

A.2 EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution, Low pH (50x) (DM829, Code K8005)

Dilute a sufficient quantity of EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution, Low pH (50x) 1:50 using distilled or deionised water for the staining procedure that is planned. If Dako PT Link is used for pre-treatment, dilution can be performed by emptying the content of the Target Retrieval Solution (50x) vial into the Dako PT Link tank and adding distilled or deionised water to the marked line (Fill Line). Unused diluted solution may be stored at 2–8 °C for one month. Discard solution if cloudy in appearance. When used in PT Link for 3-in-1 specimen preparation procedure, the diluted solution can be used 3 times within a 5 day period if stored at room temperature.

A.3 EnVision™ FLEX Wash Buffer (20x) (DM831, Code K8007)

Dilute a sufficient quantity of EnVision™ FLEX Wash Buffer (20x) 1:20 using distilled or deionised water for the staining procedure that is planned. Dilute by adding the concentrated Wash Buffer to a pre-measured quantity of distilled or deionised water to minimize foaming. Stir gently until the diluted solution appears homogenous. Unused diluted solution may be stored at 2–8 °C for one month. Discard solution if cloudy in appearance. When used in PT Link for 3-in-1 specimen preparation procedure, the diluted solution can be used 3 times within a 5 day period if stored at room temperature.

A.4 EnVision™ FLEX Substrate Working Solution

The DAB-containing EnVision™ FLEX Substrate Working Solution is prepared by mixing it thoroughly with 1 drop EnVision™ FLEX DAB+ Chromogen (DM827) per 1 mL EnVision™ FLEX Substrate Buffer (SM803). Use EnVision™ FLEX Substrate Working Solution within 5 days (store in the dark at 2–8 °C).

Specimen Collection and Preparation

The specimens should be formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections.

Fixation time is dependent on fixative and tissue type/thickness. For example, tissue blocks with a thickness of 3–4 mm should be fixed in neutral-buffered formalin for 18-24 hours.

The optimal thickness of paraffin-embedded sections is approximately 4 µm.

The specimens should be mounted on microscope slides, e.g. FLEX IHC Microscope Slides (Code K8020). The sections should be mounted on the slides as flat and wrinkle-free as possible. Too many wrinkles will have an impact on the staining results.

NOTE: The microscope slides must have a width suitable for the Autostainer Link instrument. Please refer to the Operator's Manual for the individual Dako instrument for definition of usable microscope slides.

Paraffin sections should be mounted from a pre-heated water bath containing distilled or deionized water. The water bath should contain no additives (such as gelatin, poly-L-lysine etc.). Sections should be dried by heating, generally at a temperature not above 60 °C for up to 60 minutes. To ensure proper adherence of sections to slides it is important to drain the water from beneath the sections prior to the oven drying process.

Procedure

Autostainer Link instruments use techniques based on different principles to obtain an optimal staining result. Before running protocols on your Autostainer Link instrument, please read carefully the **Operator's Manual for the dedicated Dako instrument.**

In order to ascertain reproducible epitope retrieval it is recommended always to load the slide holder fully with slides. This ensures an identical heating of sections in every run.

A. Pre-treatment procedure

Recommended 3-in-1 specimen preparation procedure using PT Link:

Deparaffinization, rehydration and heat-induced epitope retrieval (HIER) can be performed on formalin-fixed paraffin-embedded tissue sections using the 3-in-1 specimen preparation procedure:

1. Prepare a working solution by diluting the EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution (50x) concentrate 1:50 in distilled or deionized water.
2. Fill PT Link tanks with sufficient quantity (1.5 L) of working solution to cover the tissue sections.
3. Set PT Link to pre-heat the solution to 65 °C.
4. Immerse the mounted, formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections into the pre-heated EnVision FLEX™ Target Retrieval Solution (working solution) in PT Link tanks and incubate for 20 minutes at 97 °C.
5. Leave the sections to cool in PT Link to 65 °C.
6. Remove each Autostainer slide rack with the slides from the PT Link tank and immediately dip slides into a jar/tank (e.g., PT Link Rinse Station, Code PT109) with diluted, room temperature EnVision FLEX™ Wash Buffer (20x).
7. Leave slides in the diluted, room temperature EnVision FLEX™ Wash Buffer (20x) for 1–5 minutes.
8. Place slides on an Autostainer Link instrument and proceed with staining. The sections should not dry out during the treatment or during the immunohistochemical staining procedure.
9. After staining it is recommended to perform dehydration, clearing and permanent mounting.

   NOTE: When used in PT Link for 3-in-1 specimen preparation procedure, the diluted Target Retrieval Solution and diluted Wash Buffer can be used 3 times within a 5 day period if stored at room temperature.

HIER procedure using PT Link:

After deparaffinization and hydration to buffer (water), the tissue sections should be subjected to heat-induced epitope retrieval (HIER):

1. Prepare a working solution by diluting the EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution (50x) concentrate 1:50 in distilled or deionized water.
2. Fill PT Link tanks with sufficient quantity (1.5 L) of working solution to cover the tissue sections.
3. Set PT Link to pre-heat the solution to 65 °C.
4. Manually deparaffinize and rehydrate tissue sections mounted on glass slides.
5. Immerse room temperature tissue sections into the pre-heated EnVision FLEX™ Target Retrieval Solution (working solution), and incubate for 20 minutes at 97 °C.
6. Leave the sections to cool in PT Link to 65 °C.
7. Remove each slide rack from PT Link tank and immediately dip slides into a jar/tank (e.g., PT Link Rinse Station, Code PT109) with diluted, room temperature EnVision FLEX™ Wash Buffer (20x).
8. Leave slides in the diluted, room temperature EnVision™ FLEX Wash Buffer (20x) for 1–5 minutes.
9. Place slides on an Autostainer Link instrument and proceed with staining. The sections should not dry out during the treatment or during the immunohistochemical staining procedure.

10. After staining the slides should be mounted using aqueous or permanent mounting medium.

    NOTE: When used in PT Link for HIER procedure, the diluted Target Retrieval Solution and diluted Wash Buffer can be used 3 times within a 5 day period if stored at room temperature.

HIER procedure using Coplin jars:

After deparaffinization and hydration to buffer (water), the tissue sections should be subjected to heat-induced epitope retrieval (HIER):

1. Place staining jars containing diluted EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution (50x) in water bath.
2. Heat water bath and jars filled with EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution (working solution) to 95-99 ℃. Cover jars with lids to stabilize the temperature and avoid evaporation.
3. Immerse the room temperature sections in the preheated EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution (working solution) in the staining jars.
4. Bring temperature of the water bath and EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution back to 95-99 ℃. Incubate for 20 (±1) minutes at 95-99 ℃.
5. Remove the entire jar with slides from the water bath. Allow slides to cool in the EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution for 20 (±1) minutes at room temperature.
6. Decant the EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution and rinse sections with diluted, room temperature EnVision™ FLEX Wash Buffer (20x) for 1–5 minutes.
7. Place the rack with rinsed sections on an Autostainer Link instrument. Immediately begin the pre-programmed staining run.

   NOTE: When used in Coplin jars HIER procedure, the diluted Target Retrieval Solution and diluted Wash Buffer can be used only 1 time (single use).

A few epitopes do not tolerate the HIER and some require enzymatic pre-treatment. Please refer to the package insert for the individual Dako primary antibody.

The tissue sections should not dry out during the treatment or during the following immunohisto-chemical staining procedure. For greater adherence of tissue sections to glass slides, the use of FLEX IHC Microscope Slides (Code K8020) is recommended.

B. Staining procedure

Dako FLEX Ready-to-Use Primary Antibodies can be used with Dako EnVision™ FLEX detection system, applied on formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections.

A dilution guideline for Dako concentrated primary antibodies is provided in the package insert of the concentrated primary antibody.

The concentrated primary antibodies should be diluted in EnVision™ FLEX Antibody Diluent (DM830, Code K8006).

The staining steps and recommended incubation times are pre-programmed into the Autostainer Link software as the following visualization system protocols:

FLEX and FLEX 2x5 DAB (FLEX protocols)

FLEX+ Mouse and FLEX+ Mouse 2x5 DAB (FLEX+ Mouse (LINKER) protocols)

FLEX+ Rabbit and FLEX+ Rabbit 2x5 DAB (FLEX+ Rabbit (LINKER) protocols)

The recommended reagent application volume is 1 x 200 µL or 2 x 150 µL per slide. If the protocols are not available on the used Autostainer Link instrument, please contact Dako Technical Services.

Optimal incubation times of primary antibody and EnVision™ FLEX /HRP are dependent on the applied primary antibody. Please refer to the package insert for the individual Dako primary antibody. The user must verify the applied protocol.

When the staining procedure is completed, the specimens must be mounted. It is recommended to perform dehydration, clearing and permanent mounting when slides have been treated with the 3-in-1 specimen preparation procedure. Slides treated with HIER procedure can be mounted using aqueous or permanent mounting medium. For aqueous mounting, mounting media such as Dako Glycergel™

Mounting Medium, Code C0563, or Faramount Aqueous Mounting Medium Code S3025 is recommended.

Quality Control

Each staining run should include a known positive control specimen to ascertain a proper performance of all the applied reagents. If the positive control specimen fails to demonstrate positive staining, labeling of test specimens should be considered invalid.

A negative control reagent should be used with each specimen to identify any non-specific staining. If non-specific staining cannot be clearly differentiated from the specific staining, the labeling of the test specimen should be considered invalid.

Interpretation of Results

The diaminobenzidine-containing Substrate Working Solution gives a brown color at the site of the target antigen recognized by the primary antibody. The brown color should be present on the positive control specimen at the expected localization of the target antigen. If non-specific staining is present, this will be recognized as a rather diffuse, brown staining on the slides treated with the negative control reagent. Nuclei will be stained blue by the hematoxylin counterstain.

Limitations

1. For automated use on Autostainer Link instruments only. When performing manual stainings, the optimal procedure must be determined and verified by the user, unless specified in the Package Insert for the specific Dako Primary Antibody
2. For use on formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections only. When using frozen sections or cell smears, the optimal procedure must be determined and verified by the user, unless specified in the Package Insert for the specific Dako Primary Antibody. Changes in the procedure may have impact on the number of tests provided with the kit.

FRANÇAIS

Utilisation prévue

Pour utilisation en diagnostic in vitro.

Le système de détection Dako EnVision™ FLEX est destiné à être utilisé en immunohistochimie avec les appareils Autostainer Link. Le système détecte les anticorps primaires de souris et de lapin et la réaction est visualisée à l'aide de EnVision™ FLEX DAB+ Chromogen. Utilisé avec les produits EnVision™ FLEX+ Rabbit (LINKER) (réf. K8009) ou EnVision™ FLEX+ Mouse (LINKER) (réf. K8021), une amplification du signal des anticorps primaires de lapin ou de souris, respectivement, peut être obtenue. Les réactifs EnVision™ FLEX sont destinés à être utilisés sur des coupes de tissus fixées au formol et incluses en paraffine.

Résumé et explication

Conçu comme un dispositif flexible, le système de détection Dako EnVision™ FLEX permet d'obtenir une coloration optimale sur les appareils Autostainer Link à condition de respecter le protocole recommandé dans la présente notice.

Avant de procéder à la coloration, les coupes de tissus fixées au formol et incluses en paraffine doivent être soumises à un déparaffinage et à une réhydratation, puis à une procédure de démasquage d'épitope induit par la chaleur (HIER) à l'aide de la méthode de restauration des cibles indiquée dans la notice de l'anticorps primaire. Pour la procédure de préparation des échantillons 3 en 1, consulter aussi la section Procédure. La référence K8000 inclut la solution EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution, High pH (50x) (DM828). Il est également possible d'utiliser les solutions EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution, High pH (50x) (réf. K8004) ou EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution, Low pH (50x) (réf. K8005). Certains anticorps primaires nécessitent un prétraitement enzymatique du tissu pour une coloration optimale au lieu d'une procédure HIER.

La peroxydase endogène doit être bloquée à l'aide du réactif EnVision™ FLEX Peroxidase-Blocking Reagent (SM801) inclus dans le kit. En raison d'une procédure de lavage efficace et de la présence de protéines stabilisantes dans les réactifs Dako, des étapes de blocage supplémentaires ne sont pas nécessaires pour réduire la coloration de fond non spécifique.

Il est recommandé d'utiliser le tampon de lavage EnVision™ FLEX Wash Buffer (20x) (DM831) inclus dans le kit ou disponible comme réactif en option (réf. K8007).

Les anticorps primaires ne sont pas fournis dans le kit. L'utilisation des anticorps primaires prêt à l'emploi Dako FLEX ou des anticorps primaires concentrés Dako est recommandée. Le diluant EnVision™ FLEX Antibody Diluent (réf. K8006) est recommandé pour la dilution des anticorps primaires concentrés Dako.

Le produit EnVision™ FLEX+ Rabbit (LINKER) (réf. K8009) peut être appliqué pour obtenir une amplification du signal des anticorps primaires de lapin (en option). Le produit EnVision™ FLEX+ Mouse (LINKER) (réf. K8021 ou inclus dans la référence K8002) peut être appliqué pour obtenir une amplification du signal lorsque des anticorps primaires de souris sont utilisés. De manière générale : le produit EnVision™ FLEX+ Rabbit (LINKER) fournit une amplification du signal de 2 à 3 fois et le produit EnVision™ FLEX+ Mouse (LINKER) fournit une amplification du signal de 4 à 5 fois.

Le réactif de détection Dako EnVision™ FLEX /HRP (SM802) du kit se compose d'une chaîne de dextrane sur laquelle un grand nombre de molécules de peroxydase (HRP) et de molécules d'anticorps secondaire ont été couplées. Une seule réaction chimique est utilisée pour la réaction de couplage, ce qui permet la liaison de 100 molécules de HRP maximum et de 20 molécules d'anticorps maximum par chaîne.

Le système du substrat contenu dans le kit est formé de deux composants : le produit EnVision™ FLEX DAB+ Chromogen (DM827), une solution de diaminobenzidine (DAB) concentrée, et le tampon EnVision™ FLEX Substrate Buffer (SM803) contenant du peroxyde d'hydrogène. Avant emploi, le EnVision™ FLEX DAB+ Chromogen doit être dilué dans le tampon substrat EnVision™ FLEX Substrate Buffer. Le système du substrat forme un produit brun vif sur le site de l'antigène cible.

L'hématoxyline EnVision™ FLEX Hematoxylin (réf. K8008) est recommandée pour la contre-coloration. Le réactif provoque une coloration nucléaire bleu clair.

Les coupes de tissus colorées peuvent être montées soit avec un milieu de montage aqueux, soit avec un milieu de montage organique à base de solvant.

Réactifs

A. Matériel fourni

SM801 — EnVision™ FLEX PEROXIDASE-BLOCKING REAGENT

EnVision™ FLEX Peroxidase-Blocking Reagent
3 x 40 mL, prêt à l'emploi
Tampon phosphate contenant du peroxyde d'hydrogène, NaN_3 15 mmol/L et un détergent.

SM802 — EnVision™ FLEX /HRP

EnVision™ FLEX /HRP
3 x 40 mL, prêt à l'emploi
Dextrane couplé à des molécules de peroxydase et à des molécules d'anticorps secondaires de chèvre dirigés contre les immunoglobulines de souris et de lapin. Dans une solution tamponnée contenant une protéine stabilisante et un agent conservateur.

DM827 — EnVision™ FLEX DAB+ CHROMOGEN

EnVision™ FLEX DAB+ Chromogen
3 x 3 mL
Tétrahydrochlorure de 3,3'-diaminobenzidine dans un solvant organique.
La couleur de ce réactif peut varier de violet foncé à incolore, sans que cela ait une quelconque influence sur les performances du kit.

SM803 — EnVision™ FLEX SUBSTRATE BUFFER

EnVision™ FLEX Substrate Buffer
12 x 20 mL
Solution tamponnée contenant du peroxyde d'hydrogène et un agent conservateur.

DM828 — EnVision™ FLEX TARGET RETRIEVAL SOLUTION HIGH pH (50x)

EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution, High pH (50x)
9 x 30 mL, concentré 50x
Tampon Tris/EDTA, pH 9

DM831 — EnVision™ FLEX WASH BUFFER (20x)

EnVision™ FLEX Wash Buffer (20x)
4 x 1 L, concentré 20x
Solution saline de tampon Tris contenant du Tween 20, pH 7,6 (±0,1).

B. Matériel requis mais non fourni

Appareil Autostainer Link

Dako PT Link

Dako Proteinase K, Ready-to-Use (si nécessaire)

Dako FLEX Ready-to-Use Primary Antibodies ou anticorps primaires de lapin ou de souris concentrés dilués de façon appropriée obtenus auprès de Dako

Dako FLEX Ready-to-Use Rabbit ou Mouse Universal Negative Control ou réactif de contrôle négatif approprié pour l'anticorps primaire

Ustensiles pour l'appareillage Dako

Lames de microscope, par ex. les lames FLEX IHC Microscope Slides

Réactifs généraux de laboratoire pour le déparaffinage des coupes de tissus incluses en paraffine

Milieu de montage (aqueux ou organique à base de solvant) et lamelles

C. Réactifs en option

K8004
DM828

EnVision™ FLEX
TARGET RETRIEVAL SOLUTION
HIGH pH (50x)

EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution, High pH (50x)
3 x 30 mL, concentré 50x
Tampon Tris/EDTA, pH 9

K8005
DM829

EnVision™ FLEX
TARGET RETRIEVAL SOLUTION
LOW pH (50x)

EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution, Low pH (50x)
3 x 30 mL, concentré 50x
Tampon citrate, pH 6,1

K8006
DM830

EnVision™ FLEX
ANTIBODY DILUENT

EnVision™ FLEX Antibody Diluent
120 mL, prêt à l'emploi
Tampon Tris, pH 7,2, NaN_3 15 mmol/L et une protéine.

K8007
DM831

EnVision™ FLEX
WASH BUFFER (20x)

EnVision™ FLEX Wash Buffer (20x)
1 L, concentré 20x
Solution saline de tampon Tris contenant du Tween 20, pH 7,6 (±0,1).

K8008
SM806

EnVision™ FLEX
HEMATOXYLIN

EnVision™ FLEX Hematoxylin
3 x 45 mL, prêt à l'emploi
Solution aqueuse d'hématoxyline.

K8009
SM805

EnVision™ FLEX+
RABBIT (LINKER)

EnVision™ FLEX+ Rabbit (LINKER)
40 mL, prêt à l'emploi
Solution tampon contenant une protéine stabilisante et un agent antimicrobien.
Contient suffisamment de réactif pour 130 à 200 tests, sur la base de 200 à 300 µL par test.

K8021
SM804

EnVision™ FLEX+
MOUSE (LINKER)

EnVision™ FLEX+ Mouse (LINKER)
40 mL, prêt à l'emploi
Solution tampon contenant une protéine stabilisante et un agent antimicrobien.
Contient suffisamment de réactif pour 130 à 200 tests, sur la base de 200 à 300 µL par test.

Précautions

1. Pour utilisateurs professionnels.
2. Les produits EnVision™ FLEX /HRP, EnVision™ FLEX+ Mouse (LINKER) et EnVision™ FLEX+ Rabbit (LINKER) contiennent des substances d'origine animale et on ne peut exclure le fait que des quantités infimes de substances humaines puissent être présentes en raison des procédures de fabrication. Comme avec tout produit d'origine biologique, respecter les procédures de manipulation appropriées.
3. Ne pas exposer les produits EnVision™ FLEX Peroxidase-Blocking Reagent, EnVision™ FLEX /HRP, EnVision™ FLEX Substrate Buffer, EnVision™ FLEX DAB+ Chromogen, EnVision™ FLEX Substrate Working Solution ou EnVision™ FLEX Hematoxylin à une lumière intense pendant la procédure.
4. Une fiche technique de sécurité destinée aux utilisateurs professionnels est disponible sur demande pour les produits EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution, High pH (50x) et EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution, Low pH (50x).
5. Une fiche technique de sécurité destinée aux utilisateurs professionnels est disponible sur demande pour le produit EnVision™ FLEX Wash Buffer (20x).
6. Une fiche technique de sécurité destinée aux utilisateurs professionnels est disponible sur demande pour le produit EnVision™ FLEX Peroxidase-Blocking Reagent.
7. EnVision™ FLEX DAB+ Chromogen contient 1 à 5 % de tétrahydrochlorure de 3,3'-diaminobenzidine et est désigné comme :
   Nocif.
   R40 Effet cancérogène suspecté – preuves insuffisantes.
   R43 Peut entraîner une sensibilisation par contact avec la peau.
   R68 Possibilité d'effets irréversibles.
   S35 Ne se débarrasser de ce produit et de son emballage qu'en prenant toutes les précautions d'usage.
   S36/37 Porter un vêtement de protection et des gants appropriés.
   En règle générale, il n'est pas permis aux personnes âgées de moins de 18 ans de manipuler ce produit.
   Les utilisateurs doivent être informés des procédures de travail adéquates, des propriétés dangereuses du produit et des instructions de sécurité nécessaires (conformément à la directive européenne n° 94/33/CE). Veuillez vous reporter à l a fiche technique de sécurité (MSDS) pour plus d'informations.

   États-Unis : le 3,3'-diaminobenzidine (DAB) peut être nocif par inhalation, par contact avec la peau et par ingestion. Cette substance est irritante pour les yeux et la peau. En cas de contact avec la peau, rincer la zone concernée au savon et à l'eau.

   REMARQUE : bien que la diaminobenzidine soit structurellement liée à la benzidine, il n'existe aucune preuve de la cancérogénicité de la diaminobenzidine. Se reporter aux réglementations locales et nationales pour l'élimination.
8. Le produit EnVision™ FLEX Antibody Diluent (réf. K8006) contient de l'azide de sodium (NaN_3), produit chimique hautement toxique dans sa forme pure. Aux concentrations du produit, bien que non classé comme dangereux, l'azide de sodium peut réagir avec le cuivre et le plomb des canalisations et former des accumulations d'azides métalliques hautement explosives. Lors de l'élimination, rincer abondamment à l'eau pour éviter toute accumulation d'azide métallique dans les canalisations.
9. Porter un vêtement de protection approprié pour éviter le contact avec les yeux et la peau.
10. Les solutions non utilisées doivent être éliminées conformément aux réglementations locales et nationales.

Conservation

Conserver les réactifs EnVision™ FLEX et EnVision™ FLEX+ entre 2 et 8 °C.
Conserver les produits EnVision™ FLEX Peroxidase-Blocking Reagent, EnVision™ FLEX /HRP et EnVision™ FLEX Substrate Buffer dans l'obscurité entre 2 et 8 °C.
Conserver le produit EnVision™ FLEX Hematoxylin (réf. K8008) dans l'obscurité, à température ambiante. Ne pas utiliser après la date de péremption imprimée sur les flacons. Si les réactifs sont conservés dans des conditions autres que celles indiquées, celles-ci doivent être validées par l'utilisateur. La solution de travail du substrat préparée doit être conservée dans l'obscurité entre 2 et 8 °C et utilisée dans les 5 jours suivant sa préparation. En cas de coloration inattendue, ne pouvant être expliquée par un changement des procédures du laboratoire, et de suspicion d'un problème avec le produit, contacter le service technique de Dako.

Préparation des réactifs

A.1 EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution, High pH (50x) (DM828, réf. K8004)

Diluer une quantité suffisante de EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution, High pH (50x) au 1:50ème en utilisant de l'eau distillée ou déionisée pour la procédure de coloration prévue. Si l'appareil Dako PT Link est utilisé pour effectuer un prétraitement, la dilution peut être réalisée en vidant le contenu du flacon de solution de démasquage des cibles (50x) dans la cuve du Dako PT Link et en ajoutant de l'eau distillée ou déionisée jusqu'au trait indiqué (ligne de remplissage). La solution diluée non utilisée peut être conservée entre 2 et 8 °C pendant un mois. Jeter la solution si elle semble trouble. Quand on l'utilise sur un appareil PT Link pour une procédure de préparation des échantillons 3 en 1, la solution diluée peut être réutilisée 3 fois sur une période de 5 jours si elle est conservée à température ambiante.

A.2 EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution, Low pH (50x) (DM829, réf. K8005)

Diluer une quantité suffisante de EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution, Low pH (50x) au 1:50ème en utilisant de l'eau distillée ou déionisée pour la procédure de coloration prévue. Si l'appareil Dako PT Link est utilisé pour effectuer un prétraitement, la dilution peut être réalisée en vidant le contenu du flacon de solution de démasquage des cibles (50x) dans la cuve du Dako PT Link et en ajoutant de l'eau distillée ou déionisée jusqu'au trait indiqué (ligne de remplissage). La solution diluée non utilisée peut être conservée entre 2 et 8 °C pendant un mois. Jeter la solution si elle semble trouble. Quand on l'utilise sur un appareil PT Link pour une procédure de préparation des échantillons 3 en 1, la solution diluée peut être réutilisée 3 fois sur une période de 5 jours si elle est conservée à température ambiante.

A.3 EnVision™ FLEX Wash Buffer (20x) (DM831, réf. K8007)

Diluer une quantité suffisante de EnVision™ FLEX Wash Buffer (20x) au 1:20ème en utilisant de l'eau distillée ou déionisée pour la procédure de coloration prévue. Diluer en ajoutant le tampon de lavage concentré à une quantité pré-mesurée d'eau distillée ou déionisée afin de minimiser la formation de mousse. Mélanger doucement jusqu'à ce que la solution diluée apparaisse homogène. La solution diluée non utilisée peut être conservée entre 2 et 8 °C pendant un mois . Jeter la solution si elle semble trouble. Quand on l'utilise sur un appareil PT Link pour une procédure de préparation des échantillons 3 en 1, la solution diluée peut être réutilisée 3 fois sur une période de 5 jours si elle est conservée à température ambiante.

A.4 EnVision™ FLEX Substrate Working Solution

La solution de travail du substrat EnVision™ FLEX Substrate Working Solution contenant de la DAB est préparée en mélangeant vigoureusement 1 goutte de EnVision™ FLEX DAB+ Chromogen (DM827) par 1 mL de EnVision™ FLEX Substrate Buffer (SM803). Utiliser la EnVision™ FLEX Substrate Working Solution dans les 5 jours (conserver dans l'obscurité entre 2 et 8 °C).

Prélèvement et préparation des échantillons

Les échantillons doivent être des coupes de tissus fixées au formol et incluses en paraffine.

Le temps de fixation dépend du fixateur et du type/de l'épaisseur du tissu. Par exemple, les blocs de tissu d'une épaisseur de 3 à 4 mm doivent être fixés au formol neutre tamponné pendant 18 à 24 heures.

L'épaisseur optimale des coupes incluses en paraffine est d'environ 4 µm.

Les échantillons doivent être montés sur des lames de microscope, par ex. les lames FLEX IHC Microscope Slides (réf. K8020). Les coupes doivent être montées sur les lames aussi plates que possible et avec le moins de plis possible. Trop de plis aurait un impact sur les résultats de la coloration.

REMARQUE : les lames de microscope doivent posséder une largeur adaptée à l'appareil Autostainer Link. Veuillez vous reporter au manuel de l'opérateur de chaque appareil Dako pour la définition des lames de microscope utilisables.

Les coupes en paraffine doivent être montées depuis le bain préchauffé contenant de l'eau distillée ou déionisée. Le bain-marie ne doit contenir aucun additif (tel que de la gélatine, de la poly-L-lysine, etc.). Les coupes doivent être séchées en les chauffant, en général à une température ne dépassant pas 60 °C pendant 60 minutes maximum. Pour garantir une bonne adhérence des coupes aux lames, il est important d'égoutter l'eau se trouvant sous les coupes avant de passer à la procédure de séchage dans une étuve.

Procédure

Les appareils Autostainer Link utilisent des techniques basées sur différents principes afin d'obtenir un résultat de coloration optimal. Avant d'exécuter des protocoles sur les appareils Autostainer Link, veuillez lire attentivement le **Manuel de l'opérateur spécifique à l'appareil Dako utilisé**.

Pour assurer un démasquage des épitopes reproductible, il est recommandé de toujours remplir complètement le portoir à lames. Ceci assure un chauffage identique des coupes lors de chaque cycle.

A. Procédure de prétraitement

Procédure 3 en 1 recommandée pour la préparation des échantillons à l'aide du PT Link :

Le déparaffinage, la réhydratation et le démasquage d'épitope induit par la chaleur (HIER) peuvent être réalisés sur des coupes de tissus fixées au formol et incluses en paraffine en utilisant la procédure de préparation des échantillons 3 en 1 :

1. Préparer une solution de travail en diluant la solution de démasquage des cibles EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution (50x) concentrée au 1:50ème dans de l'eau distillée ou déionisée.
2. Remplir les cuves du PT Link avec une quantité de solution de travail suffisante (1,5 litres) pour recouvrir les coupes de tissus.
3. Régler le PT Link afin de préchauffer la solution à 65 °C.
4. Immerger les coupes de tissus fixées au formol et incluses en paraffine montées dans la solution de démasquage des cibles EnVision FLEX™ Target Retrieval Solution (solution de travail) préchauffée contenue dans les cuves du PT Link et incuber à 97 °C pendant 20 minutes.
5. Laisser les coupes refroidir dans le PT Link jusqu'à 65 °C.
6. Retirer chaque portoir à lames Autostainer contenant les lames de la cuve du PT Link et plonger immédiatement les lames dans un récipient/une cuve (par ex., PT Link Rinse Station, réf. PT109) contenant du tampon de lavage EnVision FLEX™ Wash Buffer (20x) dilué et à température ambiante.
7. Laisser les lames dans le tampon EnVision FLEX™ Wash Buffer (20x) dilué et à température ambiante pendant 1 à 5 minutes.

8. Placer les lames sur un appareil Autostainer Link et procéder à la coloration. Les coupes ne doivent pas sécher lors du traitement ni pendant la procédure de coloration immunohistochimique.
9. Après coloration, il est recommandé d'effectuer une déshydratation, un éclaircissement et un montage permanent.

   REMARQUE : lors d'une utilisation pour une procédure de préparation des échantillons 3 en 1 sur un appareil PT Link, la solution de démasquage des cibles diluée ainsi que le tampon de lavage dilué peuvent être utilisés 3 fois sur une période de 5 jours à condition d'être conservés à température ambiante.

Procédure HIER à l'aide du PT Link :

Après un déparaffinage et une réhydratation dans un bain de tampon (eau), les coupes de tissus doivent être soumises à un démasquage d'épitope induit par la chaleur (HIER) :

1. Préparer une solution de travail en diluant la solution de démasquage des cibles EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution (50x) concentrée au 1:50ème dans de l'eau distillée ou déionisée.
2. Remplir les cuves du PT Link avec une quantité de solution de travail suffisante (1,5 litres) pour recouvrir les coupes de tissus.
3. Régler le PT Link afin de préchauffer la solution à 65 °C.
4. Déparaffiner et réhydrater manuellement les coupes de tissus montées sur des lames de verre.
5. Immerger les coupes de tissus à température ambiante dans la solution de démasquage des cibles EnVision FLEX™ Target Retrieval Solution (solution de travail) préchauffée et incuber à 97 °C pendant 20 minutes.
6. Laisser les coupes refroidir dans le PT Link jusqu'à 65 °C.
7. Retirer chaque portoir à lames de la cuve du PT Link et plonger immédiatement les lames dans un récipient/une cuve (par ex. PT Link Rinse Station, réf. PT109) contenant du tampon de lavage EnVision FLEX™ Wash Buffer (20x) dilué et à température ambiante.
8. Laisser les lames dans le tampon EnVision™ FLEX Wash Buffer (20x) dilué et à température ambiante pendant 1 à 5 minutes.
9. Placer les lames sur un appareil Autostainer Link et procéder à la coloration. Les coupes ne doivent pas sécher lors du traitement ni pendant la procédure de coloration immunohistochimique.
10. Après coloration, un montage aqueux ou permanent des lames est recommandé.

    REMARQUE : lors d'une utilisation pour une procédure HIER sur un appareil PT Link, la solution de démasquage des cibles diluée ainsi que le tampon de lavage dilué peuvent être utilisés 3 fois sur une période de 5 jours à condition d'être conservés à température ambiante.

Procédure HIER utilisant des cuves de Coplin :

Après un déparaffinage et une réhydratation dans un bain de tampon (eau), les coupes de tissus doivent être soumises à un démasquage d'épitope induit par la chaleur (HIER) :

1. Placer les cuves de coloration contenant le produit EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution (50x) dilué dans un bain-marie.
2. Porter le bain-marie et les cuves remplies de produit EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution (solution de travail) à 95–99 °C. Couvrir les cuves pour stabiliser la température et éviter toute évaporation.
3. Immerger les coupes se trouvant à température ambiante dans la solution de démasquage des cibles EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution (solution de travail) préchauffée contenue dans les cuves de coloration.
4. Porter de nouveau le bain-marie et le produit EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution à 95–99 °C. Incuber pendant 20 minutes (±1 minute) à 95–99 °C.
5. Retirer la cuve contenant les lames du bain-marie. Laisser les lames refroidir dans le produit EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution pendant 20 minutes (±1 minute) à température ambiante.
6. Vider le produit EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution et rincer les coupes à l'aide du produit EnVision™ FLEX Wash Buffer (20x) dilué et à température ambiante pendant 1 à 5 minutes.

7. Placer le portoir contenant les coupes rincées dans un appareil Autostainer Link. Lancer immédiatement le cycle de coloration préprogrammé.

   REMARQUE : lors d'une procédure HIER avec des cuves de Coplin, n'utiliser la solution de démasquage des cibles diluée ainsi que le tampon de lavage dilué qu'une seule fois (usage unique).

Certains épitopes ne tolèrent pas la procédure HIER et requièrent un prétraitement enzymatique. Veuillez vous reporter à la notice de chaque anticorps primaire Dako.

Les coupes de tissus ne doivent pas sécher lors du traitement ni lors de la procédure de coloration immunohistochimique suivante. Pour une meilleure adhérence des coupes de tissus sur les lames de verre, il est recommandé d'utiliser des lames FLEX IHC Microscope Slides (réf. K8020).

B. Procédure de coloration

Les anticorps Dako FLEX Ready-to-Use Primary Antibodies peuvent être utilisés avec le système de détection Dako EnVision™ FLEX, appliqué sur des coupes de tissus fixées au formol et incluses en paraffine.

Une directive de dilution pour les anticorps primaires concentrés Dako est fournie dans la notice de l'anticorps primaire concentré.

Les anticorps primaires concentrés doivent être dilués dans le diluant EnVision™ FLEX Antibody Diluent (DM830, réf. K8006).

Les étapes de la coloration ainsi que les temps d'incubation recommandés sont préprogrammés dans le logiciel de l'Autostainer Link sous les protocoles des systèmes de visualisation suivants :

FLEX et FLEX 2x5 DAB (protocoles FLEX)

FLEX+ Mouse et FLEX+ Mouse 2x5 DAB (protocoles FLEX+ Mouse (LINKER))

FLEX+ Rabbit et FLEX+ Rabbit 2x5 DAB (protocoles FLEX+ Rabbit (LINKER))

Le volume de réactif recommandé devant être appliqué est de 1 x 200 µL ou 2 x 150 µL par lame. Si les protocoles ne sont pas disponibles sur l'appareil Autostainer Link utilisé, contacter le service technique de Dako.

Les temps d'incubation optimaux de l'anticorps primaire et du produit EnVision™ FLEX /HRP dépendent de l'anticorps primaire utilisé. Veuillez vous reporter à la notice de chaque anticorps primaire Dako. L'utilisateur doit vérifier le protocole appliqué.

Une fois la procédure de coloration terminée, les échantillons doivent être montés. Il est recommandé de réaliser une déshydratation, un éclaircissement et un montage permanent quand les lames ont subi une procédure de préparation des échantillons 3 en 1. Pour les lames ayant subi une procédure HIER, elles peuvent être montées avec un milieu de montage aqueux ou permanent. Pour un montage aqueux, un milieu de montage de type Dako Glycergel™ Mounting Medium (réf. C0563) ou Faramount Aqueous Mounting Medium (réf. S3025) est recommandé.

Contrôle qualité

Chaque cycle de coloration doit comprendre un échantillon de contrôle positif connu pour vérifier la bonne performance de tous les réactifs appliqués. Si l'échantillon de contrôle positif ne présente pas de coloration positive, le marquage des échantillons à analyser doit être considéré comme non valide.

Un réactif de contrôle négatif doit être utilisé avec chaque échantillon afin d'identifier toute coloration non spécifique. Si une coloration non spécifique ne peut pas être clairement différenciée de la coloration spécifique, le marquage de l'échantillon à analyser doit être considéré comme non valide.

Interprétation des résultats

La solution de travail du substrat contenant de la diaminobenzidine produit une coloration brune sur le site de l'antigène cible reconnu par l'anticorps primaire. La couleur brune doit être présente sur l'échantillon de contrôle positif là où l'antigène cible est attendu. Si une coloration non spécifique est

présente, ceci sera identifié comme une coloration brune diffuse sur les lames traitées avec le réactif de contrôle négatif. Les noyaux seront colorés en bleu par le contre-colorant hématoxyline.

Limites

1. Pour une utilisation automatisée sur les appareils Autostainer Link uniquement. Lors de la réalisation de colorations manuelles, la procédure optimale doit être déterminée et vérifiée par l'utilisateur à moins qu'elle soit spécifiée dans la notice de l'anticorps primaire spécifique de Dako.
2. Réservé à une utilisation sur des coupes de tissus fixées au formol et incluses en paraffine uniquement. Lors de l'utilisation de coupes congelées ou de frottis cellulaires, la procédure optimale doit être déterminée et vérifiée par l'utilisateur à moins qu'elle soit spécifiée dans la notice de l'anticorps primaire spécifique de Dako. Des modifications apportées à la procédure peuvent avoir une influence sur le nombre de tests que le kit permet d'effectuer.

DEUTSCH

Verwendungszweck

Zur In-vitro-Diagnostik.

Das Dako EnVision™ FLEX Nachweissystem ist für immunhistochemische Verfahren mit Autostainer Link Geräten bestimmt. Das System weist primäre Maus- und Kaninchen-Antikörper nach und stellt die Reaktion mittels EnVision™ FLEX DAB+ Chromogen dar. Durch Verwendung von EnVision™ FLEX+ Rabbit (LINKER) (Code-Nr. K8009) bzw. EnVision™ FLEX+ Mouse (LINKER) (Code-Nr. 8021) können die Signale der primären Maus- bzw. Kaninchenantikörper verstärkt werden. Die EnVision™ FLEX Reagenzien sind zur Verwendung auf formalinfixierten, paraffineingebetteten Gewebeschnitten vorgesehen.

Zusammenfassung und Erklärung

Das Dako EnVision™ FLEX Nachweissystem wurde als flexibles System konzipiert, das bei Verwendung des in dieser Packungsbeilage angegebenen Protokolls optimale Färbeergebnisse auf Autostainer Link Geräten liefert.

Vor der Färbung müssen die formalinfixierten, paraffineingebetteten Gewebeschnitte einer Entparaffinierung und Rehydrierung gefolgt von hitzeinduzierter Epitopdemaskierung (HIER) mit der in der Packungsbeilage des primären Antikörpers angegebenen Demaskierungsmethode unterzogen werden. Bitte lesen Sie dazu auch 3-in-1-Probenvorbereitung im Abschnitt Verfahren. Code-Nr. K8000 enthält EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution, High pH (50x) (DM828). Alternativ kann EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution, High pH (50x) (Code-Nr. K8004) oder EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution, Low pH (50x) (Code-Nr. K8005) eingesetzt werden. Bei einigen primären Antikörpern sind die Färbeergebnisse besser, wenn anstelle des HIER-Verfahrens eine Gewebevorbehandlung mit Enzymen vorgenommen wird.

Endogene Peroxidase sollte mit dem im Kit enthaltenen EnVision™ FLEX Peroxidase-Blocking Reagent (SM801) blockiert werden. Das wirkungsvolle Waschverfahren und die in den Dako-Reagenzien vorhandenen Stabilisierungsproteine machen weitere Blockierungsschritte zur Verminderung einer unspezifischen Hintergrundfärbung überflüssig.

Empfohlen wird der EnVision™ FLEX Wash Buffer (20x) (DM831), der im Kit enthalten oder auf Wunsch auch als optionales Reagenz einzeln (Code-Nr. K8007) erhältlich ist.

Primäre Antikörper gehören nicht zum Lieferumfang. Wir empfehlen Dako FLEX Ready-to-Use Primary Antibodies bzw. Dako Concentrated Primary Antibodies. Zur Verdünnung von Dako Concentrated Primary Antibodies wird EnVision™ FLEX Antibody Diluent (Code-Nr. K8006) empfohlen.

EnVision™ FLEX+ Rabbit (LINKER) (Code-Nr. K8009) kann wahlweise zur Verstärkung des Signals von primären Kaninchen-Antikörpern eingesetzt werden. Bei der Verwendung von primären Maus-Antikörpern kann zur Verstärkung des Signals EnVision™ FLEX+ Mouse (LINKER) (Code-Nr. K8021 oder in Code-Nr. K8002 enthalten) eingesetzt werden. Als Richtwert: EnVision™ FLEX+ Rabbit (LINKER) liefert zwei- bis dreifache Signalverstärkung, EnVision™ FLEX+ Mouse (LINKER) vier- bis fünffache Signalverstärkung.

Dako EnVision™ FLEX/HRP Detection Reagent (SM802) im Kit besteht aus einem Dextran-Backbone, an das zahlreiche Peroxidase (HRP)-Moleküle und Moleküle sekundärer Antikörper gekoppelt sind. Die Kopplungsreaktion besteht aus einer einzigartigen chemischen Reaktion, die es ermöglicht, pro Backbone bis zu 100 HRP-Moleküle und bis zu 20 Antikörper-Moleküle zu binden.

Das Substratsystem im Kit besteht aus zwei Komponenten: EnVision™ FLEX DAB+ Chromogen (DM827), einer konzentrierten Diaminobenzidinlösung (DAB-Lösung), und dem wasserstoffperoxidhaltigen EnVision™ FLEX Substrate Buffer (SM803). Vor der Anwendung muss EnVision™ FLEX DAB+ Chromogen mit EnVision™ FLEX Substrate Buffer verdünnt werden. Das Substratsystem führt zu einem kontrastreichen, braunen Endprodukt am Ort des Zielantigens.

Zur Gegenfärbung wird EnVision™ FLEX Hematoxylin (Code-Nr. K8008) empfohlen. Dieses Reagenz ruft eine deutliche Blaufärbung der Zellkerne hervor.

Für die Fixierung der gefärbten Gewebeschnitte eignen sich sowohl Fixiermittel auf wässriger Basis als auch auf Basis organischer Lösungsmittel.

Reagenzien

A. Mitgelieferte Materialien

SM801 — EnVision™ FLEX PEROXIDASE-BLOCKING REAGENT

EnVision™ FLEX Peroxidase-Blocking Reagent
3 x 40 mL, gebrauchsfertig
Wasserstoffperoxidhaltiger Phosphatpuffer, 15 mmol/L NaN_3 und Detergenz.

SM802 — EnVision™ FLEX /HRP

EnVision™ FLEX/HRP
3 x 40 mL, gebrauchsfertig
Mit Peroxidasemolekülen und sekundären Ziegenantikörpermolekülen gegen Kaninchen- und Maus-Immunglobuline gekoppeltes Dextran. In gepufferter Lösung mit Stabilisatorprotein und Konservierungsmittel.

DM827 — EnVision™ FLEX DAB+ CHROMOGEN

EnVision™ FLEX DAB+ Chromogen
3 x 3 mL
3,3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid in organischem Lösungsmittel.
Farbschwankungen bei diesem Reagenz (kräftig violett bis farblos) haben keinerlei Einfluss auf die Leistung des Kits.

SM803 — EnVision™ FLEX SUBSTRATE BUFFER

EnVision™ FLEX Substrate Buffer
12 x 20 mL
Gepufferte Lösung mit Wasserstoffperoxid und Konservierungsmittel.

DM828 — EnVision™ FLEX TARGET RETRIEVAL SOLUTION HIGH pH (50x)

EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution, High pH (50x)
9 x 30 mL, 50fach konzentriert
Tris/EDTA-Puffer, pH 9

DM831 — EnVision™ FLEX WASH BUFFER (20x)

EnVision™ FLEX Wash Buffer (20x)
4 x 1 L, 20fach konzentriert
Tris-gepufferte Kochsalzlösung mit Tween 20, pH 7,6 (±0,1).

B. Erforderliches, aber nicht mitgeliefertes Material

Autostainer Link Gerät

Dako PT Link

Dako Proteinase K, Ready-to-Use (falls erforderlich)

Dako FLEX Ready-to-Use Primary Antibodies oder entsprechend verdünnte konzentrierte primäre Kaninchen- bzw. Mausantikörper von Dako

Dako FLEX Ready-to-Use Rabbit oder Mouse Universal Negative Control oder anderes geeignetes Negativkontrollreagenz für den primären Antikörper

Zubehör für Dako-Geräte

Objektträger, z. B. FLEX IHC Microscope Slides

Für die Entparaffinierung bei paraffineingebetteten Gewebeschnitten gebräuchliche Laborreagenzien

Fixiermittel (wässrig oder auf Basis organischer Lösungsmittel) und Deckgläser

C. Optionale Reagenzien

K8004
DM828

EnVision™ FLEX
TARGET RETRIEVAL SOLUTION
HIGH pH (50x)

EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution, High pH (50x)
3 x 30 mL, 50fach konzentriert
Tris/EDTA-Puffer, pH 9

K8005
DM829

EnVision™ FLEX
TARGET RETRIEVAL SOLUTION
LOW pH (50x)

EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution, Low pH (50x)
3 x 30 mL, 50fach konzentriert
Citrat-Puffer, pH 6,1

K8006
DM830

EnVision™ FLEX
ANTIBODY DILUENT

EnVision™ FLEX Antibody Diluent
120 mL, gebrauchsfertig
Tris-Puffer, pH 7,2, mit 15 mmol/L NaN_3 und Protein.

K8007
DM831

EnVision™ FLEX
WASH BUFFER **(20x)**

EnVision™ FLEX Wash Buffer (20x)
1 L, 20fach konzentriert
Tris-gepufferte Kochsalzlösung mit Tween 20, pH 7,6 (±0,1).

K8008
SM806

EnVision™ FLEX
HEMATOXYLIN

EnVision™ FLEX Hematoxylin
3 x 45 mL, gebrauchsfertig
Wässrige Hämatoxylinlösung.

K8009
SM805

EnVision™ FLEX+
RABBIT (LINKER)

EnVision™ FLEX+ Rabbit (LINKER)
40 mL, gebrauchsfertig
Gepufferte Lösung mit Stabilisatorprotein und einer antimikrobiellen Substanz.
Ausreichend für 130–200 Tests bei Verwendung von 200–300 µL pro Test.

K8021
SM804

EnVision™ FLEX+
MOUSE (LINKER)

EnVision™ FLEX+ Mouse (LINKER)
40 mL, gebrauchsfertig
Gepufferte Lösung mit Stabilisatorprotein und einer antimikrobiellen Substanz.
Ausreichend für 130–200 Tests bei Verwendung von 200–300 µL pro Test.

Vorsichtsmaßnahmen

1. Zur Anwendung durch Fachpersonal.
2. EnVision™ FLEX/HRP, EnVision™ FLEX+ Mouse (LINKER) und EnVision™ FLEX+ Rabbit (LINKER) enthalten Material tierischen Ursprungs; es kann nicht ausgeschlossen werden, dass aufgrund der Herstellungsverfahren auch Spuren von Material menschlichen Ursprungs enthalten sind. Wie alle Produkte biologischen Ursprungs muss auch dieses entsprechend gehandhabt werden.
3. EnVision™ FLEX Peroxidase-Blocking Reagent, EnVision™ FLEX /HRP, EnVision™ FLEX Substrate Buffer, EnVision™ FLEX DAB+ Chromogen, EnVision™ FLEX Substrat Working Solution oder EnVision™ FLEX Hematoxylin während des Verfahrens keinem starken Lichteinfall aussetzen.
4. Für EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution, High pH (50x) und EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution, Low pH (50x) steht auf Anfrage für professionelle Benutzer ein Sicherheitsdatenblatt zur Verfügung.
5. Für EnVision™ FLEX Wash Buffer (20x) steht auf Anfrage für professionelle Benutzer ein Sicherheitsdatenblatt zur Verfügung.
6. Für EnVision™ FLEX Peroxidase-Blocking Reagent steht auf Anfrage für professionelle Benutzer ein Sicherheitsdatenblatt zur Verfügung.
7. EnVision™ FLEX DAB+ Chromogen enthält 1–5 % 3,3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid und ist wie folgt gekennzeichnet:
   Gesundheitsschädlich.
   R40 Krebserregende Wirkung nicht auszuschließen.
   R43 Sensibilisierung durch Kontakt mit der Haut möglich.
   R68 Irreversible Schäden möglich.
   S35 Abfälle und Behälter müssen auf sichere Weise entsorgt werden.
   S36/37 Bei der Arbeit geeignete Schutzhandschuhe und Schutzkleidung tragen.
   Personen unter 18 Jahren dürfen mit diesem Produkt grundsätzlich nicht arbeiten.
   Alle Anwender müssen sorgfältig in das richtige Arbeitsverfahren, die gefährlichen Eigenschaften des Produkts und die notwendigen Sicherheitsmaßnahmen eingewiesen werden (gemäß EU-Richtlinie 94/33/EG). Weitere Informationen bitte dem Material-Sicherheitsdatenblatt (MSDS) entnehmen.

   USA: 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) kann bei Einatmen, Hautkontakt und Verschlucken gesundheitsschädlich sein. Reizt Augen und Haut. Bei Hautkontakt betroffenen Bereich mit Seife und Wasser behandeln.

   HINWEIS: Zwischen Diaminobenzidin und Benzidin besteht zwar eine strukturelle Ähnlichkeit, dennoch ist eine krebserregende Wirkung von Diaminobenzidin nicht erwiesen. Entsprechend örtlichen und staatlichen Richtlinien entsorgen.
8. EnVision™ FLEX Antibody Diluent (Code-Nr. K8006) enthält Natriumazid (NaN_3), eine in reiner Form äußerst giftige Chemikalie. Ansammlungen von Natriumazid können auch in Konzentrationen, die nicht als gefährlich klassifiziert sind, mit Blei- und Kupferabflussrohren reagieren und hochexplosive Metallazide bilden. Nach der Entsorgung stets mit viel Wasser nachspülen, um Azidansammlungen in den Leitungen vorzubeugen.
9. Entsprechende Schutzkleidung tragen, um Augen- und Hautkontakt zu vermeiden.
10. Nicht verwendete Lösung ist entsprechend örtlichen und staatlichen Richtlinien zu entsorgen.

Lagerung

EnVision™ FLEX und EnVision™ FLEX+ Reagenzien bei 2–8 °C lagern.
EnVision™ FLEX Peroxidase-Blocking Reagent, EnVision™ FLEX/HRP und EnVision™ FLEX Substrate Buffer im Dunkeln bei 2–8 °C lagern.
EnVision™ FLEX Hematoxylin (Code-Nr. K8008) im Dunkeln bei Raumtemperatur lagern. Nach Ablauf des auf den Fläschchen aufgedruckten Verfallsdatums nicht mehr verwenden. Werden die Reagenzien anders als entsprechend den in der Packungsbeilage angegebenen Bedingungen aufbewahrt, müssen

die Bedingungen vom Anwender verifiziert werden. Die fertige Substrat-Arbeitslösung im Dunkeln bei 2–8 °C aufbewahren und innerhalb von 5 Tagen verbrauchen. Falls es zu einer unerwarteten Färbung kommt, die sich nicht durch Unterschiede bei Laborverfahren erklären lässt und auf ein Problem mit dem Produkt hindeutet, ist der technische Kundendienst von Dako zu verständigen.

Reagenzvorbereitung

A.1 EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution, High pH (50x) (DM828, Code-Nr. K8004)

Eine für das geplante Färbeverfahren ausreichende Menge EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution, High pH (50x) mit destilliertem oder entionisiertem Wasser im Verhältnis 1:50 verdünnen. Wenn Dako PT Link zur Vorbehandlung genutzt wird, kann die Verdünnung durch Überführen des Inhalts des Fläschchens Target Retrieval Solution (50x) in den Dako PT Link Tank und Hinzufügen von destilliertem oder deionisiertem Wasser bis zur Markierung (Fill Line) erfolgen. Unverbrauchte verdünnte Lösung kann bei 2–8 ℃ einen Monat lang a ufbewahrt werden. Getrübte Lösung verwerfen. Bei Verwendung im PT Link für die 3-in1-Probenvorbereitung kann die verdünnte Lösung 3mal innerhalb von 5 Tagen verwendet werden, wenn sie bei Raumtemperatur gelagert wird.

A.2 EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution, Low pH (50x) (DM829, Code-Nr. K8005)

Eine für das geplante Färbeverfahren ausreichende Menge EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution, Low pH (50x) mit destilliertem oder entionisiertem Wasser im Verhältnis 1:50 verdünnen. Wenn Dako PT Link zur Vorbehandlung genutzt wird, kann die Verdünnung durch Überführen des Inhalts des Fläschchens Target Retrieval Solution (50x) in den Dako PT Link Tank und Hinzufügen von destilliertem oder deionisiertem Wasser bis zur Markierung (Fill Line) erfolgen. Unverbrauchte verdünnte Lösung kann bei 2–8 ℃ einen Monat lang a ufbewahrt werden. Getrübte Lösung verwerfen. Bei Verwendung im PT Link für die 3-in1-Probenvorbereitung kann die verdünnte Lösung 3mal innerhalb von 5 Tagen verwendet werden, wenn sie bei Raumtemperatur gelagert wird.

A.3 EnVision™ FLEX Wash Buffer (20x) (DM831, Code-Nr. K8007)

Eine für das geplante Färbeverfahren ausreichende Menge EnVision™ FLEX Wash Buffer (20x) mit destilliertem oder deionisiertem Wasser im Verhältnis 1:20 verdünnen. Um ein Aufschäumen so weit wie möglich zu vermeiden, fügen Sie konzentrierten Wash Buffer zu einer abgemessenen Menge destilliertem oder entionisiertem Wasser hinzu. Rühren Sie gleichmäßig, bis die verdünnte Lösung homogen erscheint. Unverbrauchte verdünnte Lösung kann bei 2–8 ℃ einen Monat lang aufbewahrt werden. Getrübte Lösung verwerfen. Bei Verwendung im PT Link für die 3-in1-Probenvorbereitung kann die verdünnte Lösung 3mal innerhalb von 5 Tagen verwendet werden, wenn sie bei Raumtemperatur gelagert wird.

A.4 EnVision™ FLEX Substrate Working Solution

Die DAB-haltige EnVision™ FLEX Substrate Working Solution wird durch gründliches Mischen von 1 Tropfen EnVision™ FLEX DAB+ Chromogen (DM827) und 1 mL EnVision™ FLEX Substrate Buffer (SM803) angesetzt. Die EnVision™ FLEX Substrate Working Solution innerhalb von 5 Tagen verbrauchen (bei 2–8 ℃ im Dunklen aufbewahren).

Entnahme und Vorbereitung der Probe

Als Proben kommen formalinfixierte, paraffineingebettete Gewebeschnitte in Betracht.

Die Fixation hängt von Art/Dicke des Fixationsmittels und des Gewebes ab. Zum Beispiel sollten Gewebeblöcke mit einer Dicke von 3–4 mm in neutral gepuffertem Formalin 18-24 Stunden fixiert werden.
Die optimale Dicke paraffineingebetteter Schnitte beträgt etwa 4 µm.

Die Proben sollten auf Objektträger, zum Beispiel FLEX IHC Microscope Slides (Code-Nr. K8020), aufgebracht werden. Die Schnitte so flach und faltenfrei wie möglich auf den Objektträgern aufbringen. Zu viele Falten wirken sich negativ auf die Färbungsergebnisse aus.

HINWEIS: Die Größe der Objektträger muss zum Autostainer Link Gerät passen. Angaben zu geeigneten Mikroskop-Objektträgern bitte dem Bedienungshandbuch des jeweiligen Dako-Geräts entnehmen.

Paraffineingebettete Schnitte sollten aus einem vorgewärmten Wasserbad mit destilliertem oder entionisiertem Wasser heraus fixiert werden. Dieses Wasserbad darf keine Zusätze enthalten (wie z. B. Gelatine, Poly-L-Lysin usw.). Die Schnitte werden bis zu 60 Minuten lang unter Wärme getrocknet, gewöhnlich bei einer Temperatur von höchstens 60 °C. Damit die Schnitte gut auf den Objektträgern haften, muss vor dem Trockenprozess im Ofen alles Wasser unter den Schnitten entfernt worden sein.

Verfahren

Um optimale Färbungsergebnisse zu erzielen, arbeiten die Autostainer Link Geräte mit auf verschiedenen Prinzipien beruhenden Verfahren. Bitte lesen Sie vor der Durchführung von Färbungen mit Ihrem Autostainer Link Gerät das **Bedienerhandbuch des jeweiligen Dako-Geräts** gründlich durch.

Um für eine reproduzierbare Epitopdemaskierung zu sorgen, wird empfohlen, den Objektträgerhalter immer voll zu beladen. Dadurch wird eine gleichmäßige Erhitzung der Schnitte in jedem Durchlauf erreicht.

A. Arbeitsablauf der Vorbehandlung

Empfohlenes Verfahren zur 3-in-1 Probenvorbereitung mit PT Link:

Entparaffierung, Rehydration und hitzeinduzierte Epitopdemaskierung (HIER) können mit formalinfixierten, paraffineingebetteten Gewebeschnitten nach dem 3-in-1 Verfahren durchgeführt werden.

1. Eine Arbeitslösung durch Verdünnen der konzentrierten EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution (50x) mit destilliertem oder deionisiertem Wasser im Verhältnis 1:50 herstellen.
2. Tanks des PT Link mit einer ausreichenden Menge Arbeitslösung (1,5 L) füllen, um die Gewebeschnitte zu bedecken.
3. PT Link auf Erwärmen der Lösung auf 65 °C einstellen.
4. Tauchen Sie die auf Objektträger aufgebrachten, fomalinfixierten, paraffineingebetteten Gewebeschnitte in die vorerhitzte EnVision FLEX™ Target Retrieval Solution (Arbeitslösung) in den PT Link Tanks und lassen Sie diese 20 min bei 97 °C darin inkubieren.
5. Die Schnitte im PT Link auf 65 °C abkühlen lassen.
6. Die Autostainer-Gestelle mit den Objektträgern aus dem PT Link-Tank nehmen und die Objektträger sofort in einen Behälter/Tank (z. B. PT Link Rinse Station, Code-Nr. PT109) mit verdünntem, auf Raumtemperatur gebrachtem EnVision™ FLEX Wash Buffer (20x) tauchen.
7. Die Objektträger für 1–5 Minuten im verdünnten und auf Raumtemperatur gebrachten EnVision™ FLEX Wash Buffer (20x) belassen.
8. Objektträger in ein Autostainer Link Gerät einsetzen und mit der Färbung fortfahren. Die Gewebeschnitte dürfen während der Behandlung oder des immunhistochemischen Färbeverfahrens nicht austrocknen.
9. Nach der Färbung sollte eine Dehydrierung, Spülung und Permanentfixierung erfolgen.

   HINWEIS: Bei Verwendung im PT Link für die 3-in-1-Probenvorbereitung können die verdünnte Target Retrieval Solution und der verdünnte Wash Buffer 3 Mal innerhalb von 5 Tagen verwendet werden, wenn sie bei Raumtemperatur gelagert werden.

HIER-Verfahren mit PT Link:

Nach der Entparaffinierung und Rehydrierung mit Puffer (Wasser) ist bei den meisten Gewebeschnitten eine hitzeinduzierte Epitopdemaskierung (HIER) erforderlich.

1. Eine Arbeitslösung durch Verdünnen der konzentrierten EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution (50x) mit destilliertem oder deionisiertem Wasser im Verhältnis 1:50 herstellen.
2. Tanks des PT Link mit einer ausreichenden Menge Arbeitslösung (1,5 L) füllen, um die Gewebeschnitte zu bedecken.
3. PT Link auf Erwärmen der Lösung auf 65 °C einstellen.
4. Gewebeschnitte auf Objektträgern manuell entparaffinieren und rehydrieren.
5. Die auf Raumtemperatur gebrachten Gewebeschnitte in die vorgewärmte EnVision FLEX™ Target Retrieval Solution (Arbeitslösung) in den PT Link-Tanks geben und 20 Minuten bei 97 °C inkubieren.
6. Die Schnitte im PT Link auf 65 °C abkühlen lassen.
7. Die Gestelle aus dem PT Link-Tank nehmen und die Objektträger sofort in einen Behälter/Tank (z. B. PT Link Rinse Station, Code-Nr. PT109) mit verdünntem, auf Raumtemperatur gebrachtem Dako Wash Buffer (20x) tauchen.
8. Die Objektträger für 1–5 Minuten im verdünnten und auf Raumtemperatur gebrachten EnVision™ FLEX Wash Buffer (20x) belassen.
9. Objektträger in ein Autostainer Link Gerät einsetzen und mit der Färbung fortfahren. Die Gewebeschnitte dürfen während der Behandlung oder des immunhistochemischen Färbeverfahrens nicht austrocknen.
10. Die Objektträger nach dem Färben mit einem wässrigen oder permanenten Fixiermittel fixieren.

    HINWEIS: Bei Verwendung im PT Link für das HIER-Verfahren können die verdünnte Target Retrieval Solution und der verdünnte Wash Buffer 3 Mal innerhalb von 5 Tagen verwendet werden, wenn sie bei Raumtemperatur gelagert werden.

HIER Arbeitsverfahren mit Coplin Küvetten:

Nach der Entparaffinierung und Rehydrierung mit Puffer (Wasser) ist bei den meisten Gewebeschnitten eine hitzeinduzierte Epitopdemaskierung (HIER) erforderlich.

1. Die Färbeschalen mit verdünnter EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution (50x) in ein Wasserbad stellen.
2. Die Schalen mit der EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution (Arbeitslösung) im Wasserbad auf 95–99 °C erwärmen. Zur Temperaturstabilisierung und zum Vermeiden von Verdunstung die Schalen mit Deckeln abdecken.
3. Die auf Raumtemperatur gebrachten Gewebeschnitte in die vorgewärmte EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution (Arbeitslösung) in den Färbeschalen eintauchen.
4. Die Temperatur von Wasserbad und EnVision™ FLEX Target Solution wieder auf 95–99 °C bringen. Bei 95–99 °C 20 (±1) Minuten inkubieren.
5. Die Schale mit den Objektträgern aus dem Wasserbad nehmen. Die Objektträger in der EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution bei Raumtemperatur 20 (±1) Minuten abkühlen lassen.
6. Die EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution ausgießen und die Schnitte mit verdünntem EnVision™ FLEX Wash Buffer (20x) bei Raumtemperatur 1–5 Minuten spülen.
7. Das Gestell mit den gespülten Schnitten in ein Autostainer Link Gerät einsetzen. Sofort mit dem vorprogrammierten Färbedurchlauf beginnen.

   HINWEIS: Bei Verwendung von Coplin-Schalen für das HIER-Verfahren können die verdünnte Target Retrieval Solution und der verdünnte Wash Buffer nur ein Mal verwendet werden (Einmalgebrauch).

Einige Epitope vertragen das HIER-Verfahren nicht und andere erfordern enzymatische Vorbehandlung. Angaben bitte der Packungsbeilage des jeweiligen primären Antikörpers von Dako entnehmen.

Die Gewebeschnitte dürfen weder während der Behandlung noch während des anschließenden immunhistochemischen Färbevorgangs austrocknen. Für eine bessere Haftung der Gewebeschnitte an den Glas-Objektträgern werden FLEX IHC Microscope Slides (Code-Nr. K8020) empfohlen.

B. Arbeitsablauf des Färbens

Dako FLEX Ready-to-Use Primary Antibodies können mit dem Dako EnVision™ FLEX Nachweissystem auf formalinfixierten, paraffineingebetteten Gewebeschnitten verwendet werden.

Die Packungsbeilage der konzentrierten primären Antikörper enthält Angaben zur Verdünnung konzentrierter primärer Antikörper von Dako.

Die konzentrierten primären Antikörper sollten nur mit EnVision™ FLEX Antibody Diluent (DM830, Code-Nr. K8006) verdünnt werden.

Die Arbeitsschritte zur Färbung und die empfohlenen Inkubationszeiten sind in der Autostainer Link Software vorprogrammiert, ebenso wie die Protokolle für die Visualisierungssysteme:

FLEX und FLEX 2x5 DAB (FLEX Protokolle)

FLEX + Maus und FLEX+ Maus 2x5 DAB (FLEX+ Maus (LINKER) Protokolle)

FLEX + Kaninchen und FLEX + Kaninchen 2x5 DAB (FLEX + Kaninchen (LINKER) Protokolle)

Die zur Anwendung empfohlene Menge des Reagenz beträgt 1 x 200 µL oder 2 x 150 µL pro Objektträger. Sollten die Protokolle auf dem verwendeten Autostainer Link Gerät nicht vorhanden sein, wenden Sie sich bitte an den technischen Kundendienst von Dako.

Optimale Inkubationszeiten für den primären Antikörper und EnVision™ FLEX/HRP hängen vom verwendeten primären Antikörper ab. Angaben bitte der Packungsbeilage des jeweiligen primären Antikörpers von Dako entnehmen. Die Verifizierung des verwendeten Protokolls obliegt dem Anwender.

Nach Abschluss des Färbeverfahrens müssen die Proben fixiert werden. Es wird empfohlen, eine Dehydrierung, Reinigung und permanente Fixierung durchzuführen, wenn Objektträger mit der 3-in-1-Probenvorbereitung behandelt wurden. Mit dem HIER-Verfahren behandelte Objektträger können mit einem wässrigen oder permanenten Fixiermittel fixiert werden. Zur Fixierung in wässrigem Medium werden Fixiermittel wie Dako Glycergel™ Mounting Medium, Code-Nr. C0563, oder Faramount Aqueous Mounting Medium, Code-Nr. S3025, empfohlen.

Qualitätskontrolle

Bei jedem Färbedurchlauf sollte eine als positiv bekannte Kontrollprobe mitgeführt werden, um die Leistung aller verwendeten Reagenzien zu bestätigen. Wenn das positive Kontrollgewebe keine Färbung aufweist, muss die Markierung der Testproben für ungültig erklärt werden.

Zum Ausschluss einer unspezifischen Färbung sollte ferner stets eine Negativkontrolle mitlaufen. Ist die unspezifische Färbung nicht eindeutig von der spezifischen Färbung zu unterscheiden, muss die Markierung der Testproben für ungültig erklärt werden.

Auswertung der Ergebnisse

Die Diaminobenzidin enthaltende Substrat-Arbeitslösung erzeugt am Ort des vom primären Antikörper erkannten Zielantigens ein braunes Endprodukt. Die Braunfärbung muss am erwarteten Ort des Zielantigens auf der Positivkontrolle vorhanden sein. Eine unspezifische Färbung stellt sich als eher diffuse Braunfärbung der mit der Negativkontrolle behandelten Objektträger dar. Zellkerne werden durch die Hämatoxylin-Gegenfärbung blau gefärbt.

Einschränkungen

1. Nur für die automatisierte Benutzung in Autostainer Geräten. Falls das Färben manuell durchgeführt wird, muss der optimale Arbeitsablauf vom Benutzer ermittelt und festgelegt werden, solange dieser nicht in der Packungsbeilage für den spezifischen Dako Primary Antibody beschrieben ist.
2. Nur zur Benutzung mit formalinfixierten, paraffineingebetteten Gewebeschnitten. Bei der Benutzung gefrorener Gewebeschnitte oder Zellabstriche muss der optimale Arbeitsablauf vom Benutzer ermittelt und festgelegt werden, solange dieser nicht in der Packungsbeilage für den spezifischen Dako Primary Antibody beschrieben ist. Änderungen des Arbeitsablaufes können Auswirkungen auf die Anzahl der im Kit mitgelieferten Tests haben.

Explanation of symbols/ Explication des symboles/ Erläuterung der Symbole

REF Catalogue number Référence du catalogue Bestellnummer	Temperature limitation Limites de température Zulässiger Temperaturbereich	LOT Batch code Code du lot Chargenbezeichnung	Xn Harmful Nocif Gesundheitsschädlich
IVD In vitro diagnostic medical device Dispositif médical de diagnostic in vitro In-vitro-Diagnostikum	Store in the dark Conserver dans l'obscurité Im Dunkeln aufbewahren	Use by Utiliser avant Verwendbar bis	
Consult instructions for use Consulter les instructions d'utilisation Gebrauchsanweisung beachten	Σ Contains sufficient for <n> tests Contenu suffisant pour <n> tests Inhalt ausreichend für <n> Tests	Manufacturer Fabricant Hersteller	

The Dako EnVision™ Systems are covered by U.S. Patent 5,543,332 and European Patent 594,772.

Les systèmes Dako EnVision™ sont couverts par le brevet américain 5,543,332 et le brevet européen 594,772.

Die Dako EnVision™ Systeme sind durch folgende Patente geschützt: US-Patent 5,543,332 und Europäisches Patent 594,772.

Produced by/ Produit par/ Hersteller:
Dako Denmark A/S
Produktionsvej 42
DK-2600 Glostrup
Denmark/ Danemark/ Dänemark
Tel. +45 44 85 95 00
Fax +45 44 85 95 95